



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 38 526 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 02 B 21/00**  
G 01 J 3/443  
G 01 N 21/25

⑳ Aktenzeichen: 100 38 526.5  
㉔ Anmeldetag: 8. 8. 2000  
㉕ Offenlegungstag: 28. 2. 2002

**DE 100 38 526 A 1**

⑦① Anmelder:  
Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena, DE

⑦② Erfinder:  
Wolleschensky, Ralf, Dipl.-Phys., 99510 Apolda, DE;  
Möhler, Gunter, Dipl.-Ing., 07745 Jena, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:  
DE 197 02 914 C2  
DE 69 402 95 8T2  
DE 69 327 90 9T2

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren und Anordnung zur Erfassung des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe

⑤⑦ Verfahren zur Anordnung zum Betrieb eines bildgebenden optischen Systems zur Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions- und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/oder Lumineszenz und/oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, vorzugsweise zum Betrieb eines Laserscanmikroskops, mit detektionsseitig orts aufgelöster wellenlängenabhängiger Zerlegung der Bildpunktinformation der Probe in Spektralkomponenten, wobei für unterschiedliche Spektralkomponenten mindestens eine Summierung erfolgt.

**DE 100 38 526 A 1**

## Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Laser Scanning Mikroskopie, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und der Scanning Nahfeldmikroskopie, zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierenden Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Screening). Durch den Übergang von der Detektion von wenigen breiten spektralen Farbstoffbändern zur simultanen Aufnahme kompletter Spektren eröffnen sich neue Möglichkeiten bei der Identifikation, Separation und Zuordnung der meist analytischen oder funktionalen Probeneigenschaften zu räumlichen Teilstrukturen oder dynamischen Prozessen. Simultan-Untersuchungen von Proben mit Mehrfachfluorophoren werden damit bei überlappenden Fluoreszenzspektren auch in räumlichen Strukturen von dicken Proben möglich. Die Datenaufnahmerate wird durch die Anordnung nicht verringert.

## Stand der Technik

[0002] Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, "Handbook of biological confocal Microscopy"; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

[0003] Die eingestrahlenen Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur Anregungsstrahlung generell rot verschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

[0004] Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung, der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitischen Strahlteiler verwendet.

[0005] Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hochenergetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr einem Vielfachen des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems"; Academic Press 1996). Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflusst, d. h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Ver-

gleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

[0006] Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

[0007] Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE 197 02 753 A1 verwiesen.

[0008] Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z. B. durch den Einsatz eines akusto optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

[0009] Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rastert punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

[0010] Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht, das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende/Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

[0011] Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen in dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descanned Detektion).

[0012] In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descanned Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descanned Detektion).

[0013] Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe gene-

riert werden.

[0014] Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

[0015] In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffen gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden (Abb. 3a). Abb. 3a zeigt die Emissionsspektren von verschiedenen typischen Farbstoffen. Aufgetragen ist das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist, daß sich die mit 1 bis 4 bezeichneten Farbstoffe in der Lage und Form ihrer Emissionsspektren unterscheiden. Zum getrennten Nachweis erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in verschiedenen Punktdetektoren (PMT x). Eine flexible Anpassung der Detektion und der Anregung an entsprechende neue Farbstoffeigenschaften durch den Anwender ist mit der oben beschriebenen Anordnung nicht möglich. Statt dessen müssen für jeden (neuen) Farbstoff neue dichroitische Strahlteiler und Blockfilter kreiert werden.

[0016] In einer Anordnung gemäß WO 95/07447 wird das Fluoreszenzlicht mit Hilfe eines Prismas spektral aufgespalten. Das Verfahren unterscheidet sich von der oben beschriebenen Anordnung mit dichroitischen Filtern nur dadurch, dass der verwendete Filter in seiner Charakteristik einstellbar ist. Es werden jedoch weiterhin pro Punktdetektor vorzugsweise das Emissionsband eines Farbstoffs aufgezeichnet.

[0017] Ein schneller Wechsel der Detektionsbereiche ist mit beiden Anordnungen nur bedingt möglich, da die Einstellung des Emissionsbereiches auf mechanischen Bewegungen des dichroitischen Filters bzw. von Blenden beruht. Ein schneller Wechsel wird z. B. dann benötigt wenn sich die Emissionsspektren wie in Abb. 3b dargestellt überlagern jedoch die Absorptionseigenschaften verschieden sind. Abb. 3b zeigt die Emissionssignale in Abhängigkeit von der Wellenlänge für die Farbstoffe CFP, Topas, CFT und CyanFP. Dieses Verfahren (Multitracking) ist in DE 198 29 981 A1 beschrieben. Diese Farbstoffe sind zur Untersuchung von Lebendpräparaten besonders geeignet da sie keine toxischen Wirkungen auf die zu untersuchenden Proben ausüben. Um beide Farbstoffe CFP, CFT möglichst effizient detektieren zu können wird in einer Scanrichtung CFP mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und die Fluoreszenz von 460–550 nm detektiert. Auf dem Rückweg des Scanners erfolgt die selektive Anregung von GFP mit 488 nm und eine Detektion des Wellenlängenbereiches von 490–650 nm.

[0018] Ist die Lage des Emissionsspektrums der verwendeten Farbstoffe unbekannt oder tritt eine von der Umgebung abhängige Verschiebung des Emissionsspektrums (Abb. 3c) auf so ist eine effiziente Detektion der Farbstofffluoreszenzen nur bedingt möglich. In Abb. 3c ist wiederum das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Wellenlänge dargestellt. Die Wellenlängenverschiebung kann bis zu mehreren 10 nm betragen. Zur Vermessung des Emissionsspektrums in der Probe werden heutzutage Spektrometer auch in Verbindung mit einem LSM eingesetzt. Hierbei wird

statt eines Punktdetektors ein herkömmliches meist hochauflösendes Spektrometer verwendet (Patent Dixon, et al. US 5,192,980). Diese können jedoch nur punktuell oder gemittelt über ein Gebiet ein Emissionsspektrum aufzeichnen.

Es handelt sich also um eine Art der Spektroskopie.

[0019] In einer weiteren Applikation der Fluoreszenzmikroskopie wird die Ionenkonzentration (z. B.:  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^+$ , ...) insbesondere in biologischen Präparaten bestimmt. Hierzu werden spezielle Farbstoffe oder Farbstoffkombinationen (z. B. Fura, Indo, Fluo; Molecular Probes, Inc.) verwendet, die eine spektrale Verschiebung in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration besitzen. Abb. 4a) zeigt die Emissionsspektren von Indo-1 in Abhängigkeit von der Konzentration der Kalziumionen. Abb. 4b) zeigt ein Beispiel für die Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Kalzium Ionenkonzentration bei Verwendung der Kombination von Fluo-3 und Fura Red-Farbstoffen. Diese speziellen Farbstoffe werden als Emissionsratiofarbstoffe bezeichnet. Summiert man die beiden in Abb. 4a dargestellten Fluoreszenzbereiche und bildet das Verhältnis (Ratio) beider Intensitäten, so kann auf die entsprechende Ionenkonzentration rückgeschlossen werden. Meist werden bei diesen Messungen dynamische Änderung der Ionenkonzentration in Lebendpräparaten untersucht, die eine Zeitauflösung von weniger als einer Millisekunde erfordern.

[0020] Aufgabe der Erfindung sind daher neue Methoden zur flexiblen und frei programmierbaren Detektion. Diese Methoden sollen in bildgebenden wie in analytischen Mikroskopiersystemen eingesetzt werden können. Die Mikroskopsysteme sind bildgebende Systeme wie Laser-Scanning-Mikroskope zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen Auflösung bis zu 200 nm, Scanning-Nahfeld-Mikroskope zur hochauflösenden Untersuchung von Oberflächen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm. Fluoreszenzkorrelations-Mikroskope zur quantitativen Bestimmung von Molekülkonzentrationen und zur Vermessung von Molekül-Diffusionen. Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen eingeschlossen.

[0021] In all den o. g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt. Die o. g. Aufgabe wird durch Verfahren und Anordnungen gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst. Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

#### Beschreibung der Erfindung

[0022] Hintergrund des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine spektral aufgespaltete Detektion der Fluoreszenz. Dazu wird das Emissionslicht im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe eines Elementes zur Trennung der Anregungsstrahlung von der detektierten Strahlung wie dem Hauptfarbteiler (MDB) oder einem AOTF gemäß 7346DE oder gemäß 7323DE vom Anregungslicht abgespalten. Bei Durchlichtanordnungen kann ein derartiges Element auch völlig entfallen. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in Abb. 5 dargestellt. Das Licht L der Probe wird nun mit Hilfe von einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Blende (Pinhole) PH fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion entfällt die Blende. Das Licht wird nun mit Hilfe eines winkeldispersiven Elements DI in seine Spektralanteile zerlegt. Als winkeldispersive Elemente kommen Prismen, Gitter und beispielsweise akustooptische Elemente in Frage. Das vom dispersiven Element in seine spektralen Komponenten aufgespaltete Licht wird

im Anschluß auf einen Zeilendetektor DE abgebildet. Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal S in Abhängigkeit von der Wellenlänge und wandelt dies in elektrische Signale um. Zusätzlich kann der Detektionseinheit noch ein Linienfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet werden.

[0023] Eine mögliche Ausführungsform des optischen Strahlenganges der in **Abb. 5** im Blockschaltbild gezeigten Detektoreinheit ist in **Abb. 6** dargestellt. Der Aufbau beschreibt im wesentlichen einen Cerny Turner Aufbau. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Blende PH fokussiert. Bei einer nichtdescannten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel S1 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf ein Liniengitter G, beispielsweise ein Gitter mit einer Linienzahl von 651 Linien pro mm. Das Gitter beugt das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen. Der zweite abbildende Spiegel S2 fokussiert die einzelnen spektral aufgespaltenen Wellenlängenanteile auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor besitzt dann 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Der freie Spektralbereich der oben beschriebenen Ausführungsform beträgt etwa 350 nm. Der freie Spektralbereich wird in dieser Anordnung gleichmäßig auf die 32 Kanäle des Zeilendetektors verteilt, wodurch sich eine optische Auflösung von etwa 10 nm ergibt. Somit ist diese Anordnung nur bedingt zur Spektroskopie geeignet. Jedoch ist ihr Einsatz in einem bildgebenden System vorteilhaft, da das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Spektralbandes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung des freien Spektralbereiches kann zusätzlich durch eine Verdrehung beispielsweise des Gitters erfolgen.

[0024] Eine weitere mögliche Ausführungsform könnte die Verwendung eines Matrixdetektors (z. B. eine CCD, Hersteller Sony, Kodak . . .) beinhalten. Hierbei wird in einer Koordinate durch das dispersive Element eine Aufspaltung in verschiedene Wellenlängenanteile vorgenommen. In der verbleibenden Richtung auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines Linienscanners (Lit.: Corle, Kino; "Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems"; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach **Abb. 2**. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Die Linie wird durch das Einschalten einer Zylinderlinse ZL (in **Abb. 2** gestrichelt dargestellt) vor dem Scanner erzeugt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Schlitzblende. Eine nichtdescannte Detektion insbesondere bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung wie in **Fig. 2** dargestellt, erfolgen. Weiterhin kann die Schlitzblende bei Mehrphotonenabsorption entfallen.

[0025] In den oben beschriebenen Ausführungsform(en) detektiert jeder Einzelkanal ein Spektralband des Emissionsspektrums mit einer spektralen Breite von ca. 10 nm. Die Emission der für die Fluoreszenzmikroskopie relevanten Farbstoffe erstreckt sich jedoch über einen Wellenlängenbereich von mehreren 100 nm. Deshalb erfolgt in der erfindungsgemäßen Anordnung eine Summation der Einzelkanäle entsprechend der Fluoreszenzbänder der verwendeten Farbstoffe. Hierzu wird im ersten Schritt ein so genannter

Spektralscan durchgeführt, der die Informationen der Einzelkanäle z. B. als Bildinformation ausliest. Hierbei wird die Probe vorteilhaft mit mehreren Anregungswellenlängen entsprechend der verwendeten Farbstoffe bestrahlt. Für jeden Bildpunkt wird also die Summe der Spektralkomponenten der einzelnen Farbstoffe, die sich an dem gerade gemessenen Bildpunkt befinden, aufgezeichnet.

[0026] Im Anschluß kann der Nutzer beliebig die einzelnen Kanäle zu Detektionsbändern (Emissionsbändern) zusammenfassen also aufsummieren. Die Auswahl der Summationsbereiche kann beispielsweise durch die Darstellung der Signale je Bildpunkt in den Einzelkanälen in einem Histogramm erfolgen. Das Histogramm repräsentiert die Summe aller Emissionsspektren der in der Probe verwendeten Farbstoffe. Diese Summation erfolgt vorteilhaft entsprechend den Emissionsspektren der angeregten Farbstoffe, wobei die jeweiligen Anregungswellenlängen ausgeblendet und Signale verschiedener Farbstoffe in verschiedenen Detektionsbändern summiert werden.

[0027] Mit der erfindungsgemäßen Anordnung ist ein schneller Wechsel der Detektionsbänder für Multitracking-Anwendungen, d. h. für einen Wechsel der Bestrahlungswellenlänge und/oder Intensität während des Scanvorganges, wie in DE 198 29 981 A1 beschrieben, möglich. Der Wechsel kann pixelgenau erfolgen, d. h. in einem Zeitraum von einigen  $\mu$ s. Dadurch ist beispielsweise auch die Betrachtung von bestimmten Regionen der zu untersuchenden Probe mit unterschiedlichen Detektionsbändern (ROI-Tracking) möglich. **Abb. 7a** zeigt schematisch eine Verteilung von verschiedenen Regionen besonderen Interesses (ROI 1-4) in einem LSM-Bild, die beispielsweise verschieden angefarbte Regionen einer Zelle repräsentieren. In **Abb. 7b** sind typische zugehörige Emissionsspektren 1-4 mit ihren Anregungswellenlängen (L1-L4) dargestellt. Aufgrund der starken spektralen Überlagerung der Emissionsspektren der Einzelfarbstoffe bietet sich zur Detektion der Einzelfarbstoffe das Multitracking Verfahren CZ7302 an, da sich die Absorptionseigenschaften der Einzelfarbstoffe stark unterscheiden. Bei diesem Verfahren nach dem Stand der Technik werden die einzelnen Farbstoffe selektiv angeregt und bisher nacheinander in diesem Falle 4 komplette Bilder gescannt. Eine Umkonfiguration der Detektionseinheiten nach dem Stand der Technik zwischen den einzelnen ROIs erfordert die Bewegung von mechanischen Detektionskomponenten und ist daher nicht mit einer Geschwindigkeit von einigen Mikrosekunden möglich, wie es für schnelle Vergleiche mehrerer dynamisch Prozesse in verschiedenen Regionen, z. B. bei stark bleichenden oder sich bewegenden Proben und schnell ablaufenden Prozessen wünschenswert ist. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist jedoch eine schnelle Umgruppierung der Summationsbänder zwischen den einzelnen ROIs durch den Nutzer oder Computer möglich. Die Probe muß nur noch einmal zur Aufnahme sich stark überlappender ROIs gescannt werden. Dies ist besonders vorteilhaft bei stark bleichenden Präparaten. Weiterhin können schnell ablaufende Veränderungen/Kontraste zwischen einzelnen Regionen (ROIs) sichtbar gemacht werden. Dies ist beispielweise dann sinnvoll, wenn z. B. das Diffusionsverhalten in biologischen Umgebungen untersucht werden soll. Hierzu werden an bestimmten Stellen der Probe Farbstoffe gebleicht und im Anschluß der Zufluß von neuem Farbstoff untersucht. In einem weiteren Verfahren werden so genannte Caged Compounds verwendet. Durch ein gezieltes Anregen dieser Farbstoffe können beispielsweise Kalziumionen in Neuronen freigesetzt werden. Diese Ionenkonzentrationsänderungen können im Anschluß mit Änderungen in anderen Regionen der Probe korreliert werden.

[0028] Die Einstellung der ROIs durch den Nutzer kann beispielsweise wie folgt geschehen: Nach der Aufnahme eines Spektralscans unter Verwendung aller oder der meisten zum Anregen der Farbstoffe in den einzelnen ROIs notwendigen Anregungslinien können Summenkanäle zwischen den einzelnen Anregungslaserlinien gebildet werden (L1 bis L2, L2 bis L3, L3 bis L4 und L4 gemäß Fig. 7b bis zur maximalen Emissionswellenlänge). Diese Summenkanäle entsprechen Teilen der Fluoreszenzbänder der einzelnen Farbstoffe. Weiterhin erfolgt eine gleichzeitige Summation der Signale verschiedener Farbstoffe in gleichen Summenkanälen aufgrund der starken Überlagerung. Diese Summenkanäle werden im Anschluß farbkodiert in verschiedenen Bildkanälen abgelegt und miteinander überlagert dargestellt. Aufgrund der verschiedenen lokalen Farbmischungen in den Bildkanälen können die verschiedenen ROIs durch den Nutzer oder durch automatische Mustererkennung lokalisiert und spezielle Summationseinstellungen beispielsweise gemäß der am stärksten auftretenden Farbe für die einzelnen ROIs definiert werden.

[0029] In einem 2. Verfahren zur Einstellung der verschiedenen ROIs erfolgt eine Vermessung des Fluoreszenzschwerpunktes. Hierzu werden im Detektor alle Einzelkanäle, die mit Anregungslaserlinien bestrahlt werden abgeschaltet. Jede ROI besitzt aufgrund der veränderten Emissionseigenschaften der jeweils verwendeten Farbstoffe einen charakteristischen Fluoreszenzschwerpunkt.

[0030] Somit können die verschiedenen ROIs durch die Lage des charakteristischen Farbschwerpunktes unterschieden und getrennt sichtbar gemacht werden. Im Anschluß erfolgt wiederum eine spezifisch den Farbstoffeigenschaften angepaßte Einstellung der Summenkanäle für die einzelnen ROIs.

[0031] Zusätzlich sind beliebige Einzelkanäle auch durch den Nutzer abschaltbar. Dies ist besonders zur Unterdrückung einer oder mehrerer Anregungslaserlinien sinnvoll.

[0032] Bei der Bestimmung von Ionenkonzentrationen nach Abb. 4 werden die Summensignale durcheinander geteilt und man erhält dadurch ein Maß für die Höhe der Ionenkonzentration.

[0033] Bei der Verwendung des Verfahrens in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie kann eine Autokorrelation eines Summenkanals und/oder eine Kreuzkorrelation zwischen mehreren Summenkanälen erfolgen.

[0034] Die Berechnung der Emissionsbänder kann digital oder auch analog erfolgen. Beide Anordnungen werden im folgenden näher beschrieben. Eine Anordnung zur digitalen Berechnung des Summensignals ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Hierbei wird der an den Anoden eines Mehrkanal-PMT fließende Strom, jeweils durch den ersten Amplifier A (als Strom-Spannungswandler geschaltet) in eine Spannung gewandelt und verstärkt. Die Spannung wird einem Integrator I zugeführt der über eine entsprechende Zeit (z. B. Pixelverweilzeit) das Signal integriert.

[0035] Zur schnelleren Auswertung kann dem Integrator I ein Komparator K nachgeschaltet werden, der als einfacher Komparator eine Schaltschwelle hat, die bei Überschreitung ein digitales Ausgangssignal erzeugt oder der als Fensterkomparator ausgebildet ist und dann ein digitales Ausgangssignal bildet, wenn sich das Eingangssignal zwischen der oberen und unteren Schaltschwelle befindet oder wenn das Eingangssignal außerhalb (unter oder über) den Schaltschwellen liegt. Die Anordnung des Komparators bzw. des Fensterkomparators kann sowohl vor dem Integrator als auch danach erfolgen. Schaltungsanordnungen ohne Integrator (so genannte Verstärkermode) sind ebenfalls denkbar. Bei der Anordnung im Verstärkermode ist weiterhin der Komparator K auch nach entsprechender Pegelanpassung

vorhanden. Der Ausgang des Komparators K dient als Steuersignal für ein Switch-Register SR, das direkt die aktiven Kanäle schaltet (online) oder der Zustand wird dem Computer über eine zusätzliche Verbindung V mitgeteilt, um eine individuelle Auswahl der aktiven Kanäle zu treffen (offline). Das Ausgangssignal des switch-Registers SR wird direkt einem weiteren Verstärker A1 zur Pegelanpassung, für die nachfolgende A/D-Wandlung AD zugeführt. Die AD gewandelten Werte werden über geeignete Datenübertragung an einen Rechner (PC oder Digital-Signal-Prozessor DSP) übertragen, der die Berechnung des/der Summensignale(s) durchführt.

[0036] Ein auf analoger Datenverarbeitung basierendes Äquivalent der Anordnung in Abb. 8 ist in Abb. 9 dargestellt. Die Signale der Einzelkanäle werden hierbei wiederum mit einem Verstärker A in Spannungssignale transformiert.

[0037] Anschließend werden die einzelnen Spannungssignale in einem Integrator I während der Pixelverweilzeit aufintegriert.

[0038] Dem Integrator nachgeschaltet ist ein Komparator K der einen Vergleich des aufintegrierten Signals mit einem Referenzsignal durchführt.

[0039] Falls das aufintegrierte Signal kleiner als die Komparatorschwelle ist, so würde in dem entsprechenden Einzelkanal kein oder ein zu kleines Fluoreszenzsignal gemessen. In einem solchen Falle soll das Signal des Einzelkanals nicht weiter verarbeitet werden, da dieser Kanal nur einen Rauschanteil zum Gesamtsignal beiträgt. Der Komparator betätigt in einem solchen Falle über SR einen Schalter und der Einzelkanal wird für den gerade gemessenen Pixel ausgeschaltet. Mit Hilfe der Komparatoren in Kombination mit den Schaltern wird also automatisch der für den gerade gemessenen Bildpunkt relevante Spektralbereich ausgewählt.

[0040] Im Anschluß kann das integrierte Spannungssignal der Einzelkanäle mit einem mit dem Switch-Register SR verbundenen Demultiplexer MPX auf verschiedene Summenpunkte durch das Register Reg1 geschaltet werden. In Abb. 9 sind 8 verschiedene Summenpunkte SP eingezeichnet. Die Steuerung des Registers Reg1 erfolgt durch eine Steuerleitung V1 vom Rechner. Jeweils ein Summenpunkt SP bildet jeweils einen Teil des Summationsverstärkers SV, der die Summation der ausgewählten Einzelkanäle durchführt. Insgesamt sind in Abb. 8 8 Summenverstärker SV dargestellt. Die Summensignale werden im Anschluß mit jeweils einem Analog-Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt und vom Computer oder DSP weiterverarbeitet. Die Summenverstärker SV können auch mit einer veränderlichen nichtlinearen Kennlinie betrieben. In einer weiteren Anordnung (digitale (nach Abb. 8) und analoge Detektion (nach Abb. 9)) erfolgt eine Manipulation bzw. Verzerrung der Eingangssignale der Einzeldetektionskanäle durch: eine Veränderung der Verstärkung von (A), eine Veränderung der Integrationszeiten von (I), durch ein Einspeisen eines zusätzlichen Offsets vor dem Integrator und/oder durch eine digitale Beeinflussung der gezählten Photonen bei einer Photonenanzahlordnung. Beide Methoden können auch beliebig miteinander kombiniert werden.

[0041] Für die Vermeidung von Artefakten ist es bei einer Fluoreszenzmessung notwendig das von der Probe rückgestreute Anregungslicht zu unterdrücken oder zumindest so stark abzuschwächen, dass es kleiner als oder in der gleichen Größenordnung wie das Emissionsmaximum ist. Hierzu kann der oben beschriebene zusätzliche Linienfilter oder ein entsprechend optimierter Hauptfarbteiler (MDB) zur optischen Abschwächung verwendet werden. Da die spektrale Breite der Anregungslaserstrahlung sehr viel kleiner als die vom Einzelkanal detektierte Bandbreite ist, kann

die rückgestreute bzw. reflektierte Anregungsstrahlung auch durch ein gezieltes Ausschalten des entsprechenden Einzelkanals mit dem in **Abb. 9** dargestellten MPX erfolgen. Trifft die Anregungswellenlänge auf zwei Detektionskanäle so kann durch eine Verdrehung des Gitters, eine Verschiebung des Zeilendetektor oder eine Verkippung von S1 oder S2 in **Abb. 6** die Anregungslinie so verschoben werden, dass sie nur auf einen Detektionskanal fällt.

[0042] Die Anordnung nach **Abb. 9** hat gegenüber Anordnung nach **Abb. 8** mehrere Vorteile. Der auffälligste Vorteil ist, dass lediglich die Summenkanäle (also die Detektionsbänder der verwendeten Farbstoffe) in digitale Daten gewandelt und an den Computer gesendet werden müssen. Dadurch werden die vom Computer zu verarbeitenden Datenraten minimiert. Dies ist besonders wichtig bei der Anwendung des Verfahrens in der Echtzeitmikroskopie bei der beispielsweise mehr als 50 Bilder mit  $512 \times 512$  Pixeln und 12 bit Pixeltiefe detektiert werden müssen, um die extrem schnell ablaufenden dynamischen Prozesse registrieren zu können. Beim Einsatz dieses Verfahrens sind weiterhin keine Grenzen an die Anzahl der Einzelkanäle des verwendeten Zeilendetektor (Matrixdetektors) und damit an die Größe des detektierbaren Spektralbereiches und/oder die spektrale Auflösung des Spektorsensors gesetzt.

[0043] Weiterhin sind bei der in **Abb. 8** dargestellten Vorrichtung die zu wandelnden Signalpegel wesentlich kleiner. Dadurch ist das zu erwartende Signal zu Rauschverhältnis geringer.

[0044] In den beide oben beschriebenen Anordnungen wurde vorzugsweise eine Integratorschaltung zur Detektion der Einzelkanalsignale verwendet. Uneingeschränkt kann jedoch auch eine Photonenanzahl in den Einzelkanälen erfolgen und die Photonenzahlen addiert werden. Die in **Abb. 8** dargestellte Anordnung hat jedoch den Vorteil, dass sie neben dem Summensignalen auch noch die komplette Spektralinformation zur nachträglichen Bildverarbeitung zur Verfügung stellt. Die Erfindung schließt deshalb auch eine Kombination beider Anordnungen ein.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Betrieb eines bildgebenden optischen Systems zur Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions- und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/oder Lumineszenz und/oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, vorzugsweise zum Betrieb eines Laserscanmikroskopes, mit detektionsseitig orts aufgelöster wellenlängenabhängiger Zerlegung der Bildpunktinformation der Probe in Spektralkomponenten, wobei für unterschiedliche Spektralkomponenten mindestens eine Summierung erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zum Betrieb eines scannenden Systems, wobei innerhalb eines Scanvorgangs zwischen verschiedenen Probenbereichen ein Wechsel mindestens einer Bestrahlungswellenlänge und/oder Bestrahlungsintensität erfolgt und für unterschiedliche Probenbereiche und/oder Bestrahlungswellenlängen/-intensitäten eine Summierung mindestens eines Teiles der jeweiligen Spektralkomponenten erfolgt.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer bildlichen Darstellung der summierten Bereiche.
4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mehrere Teilsummen gebildet und dann addiert werden.

5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer Überlagerung von Teilsummen von Spektralkomponenten, die überlagerte Signale verschiedener Fluoreszenzkomponenten enthalten.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch die Kombination mit spektraler Schwerpunktbildung für mehrere Spektralkomponenten.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, mit mathematischer Verknüpfung wie Quotienten- oder Differenzbildung von Teilsummen oder Einzelkomponenten und bildlicher Darstellung der Verknüpfung.
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions- und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/oder Lumineszenz und/oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, wobei die Emissionsstrahlung mit einem dispersiven Element spektral aufgespalten wird, orts aufgelöst detektiert und elektronisch mindestens ein Summensignal der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten Strahlung bestimmt wird.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgespaltenen Emissionsstrahlung zur: Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt.
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgeweiteten reflektierten, rückgestreuten und/oder transmittierten Anregungsstrahlung von Fluorochromen zur: Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt.
11. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens in Abhängigkeit von den Anregungsparametern variiert werden kann (Multitracking).
12. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens in Abhängigkeit von der jeweiligen Scanposition variiert werden kann (ROI-Tracking).
13. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und

in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

14. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt.

15. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte, rückgestreute und/oder transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

16. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen werden und die Summation digital in einem Rechner erfolgt.

17. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels eines Demultiplexers in Kombination mit einem Summationsverstärkers erfolgt.

18. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der Eingangssignale beeinflusst werden.

19. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt.

20. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt.

21. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale zur Generierung eines Bildes verwendet wird.

22. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird.

23. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt.

24. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale mit einer lookup-Tabelle kombiniert werden.

25. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe und/oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt.

26. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt.

27. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen Detektionskanals erfolgt.

28. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs erfolgt.

29. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer Integratorschaltung generiert werden.

30. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und anschließender Digital/Analogwandlung generiert werden.

31. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonenzählung zeitkorrigiert erfolgt.

32. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz.

33. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening, wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Mikroskop.

34. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

35. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

36. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels konfokaler Detektion.

37. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung.

38. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung.

39. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scantisch.

40. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels nichtkonfokaler Detektion.

41. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung.

42. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit descannter Detektion.

43. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Hellfeldabbildung.

44. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Punktabbildung.

45. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit nicht descannter Detektion.

46. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Hellfeldabbildung.

47. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt- oder Hellfeldabbildung.

48. Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scantisch.

49. Anordnung zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions- und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/oder Lumineszenz und/oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz, wobei die Emissionsstrahlung mit einem dispersiven Element spektral aufgespalten wird, orts aufgelöst detektiert und elektronisch mindestens ein Summensignal der Emissionsstrahlung und/oder der absorbierten Strahlung bestimmt wird.

50. Anordnung nach Anspruch 49, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgespaltenen Emissionsstrahlung zur:

Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/oder

zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren



Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt.

51. Anordnung nach Anspruch 49 oder 50, wobei die Bestimmung des Summensignals der spektral aufgeweiteten reflektierten oder transmittierten Anregungsstrahlung von Fluorochromen zur:

Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen erfolgt.

52. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens variiert werden kann (Multitracking).

53. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung der Summensignale während des Scannens variiert werden kann (ROI-Tracking).

54. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Aufspaltung der Fluoreszenzstrahlung erfolgt.

55. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur Absorptionsmessung die von der Probe reflektierte oder transmittierte Strahlung mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

56. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen werden und die Summation digital in einem Rechner erfolgt.

57. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summation mit analoger Datenverarbeitung mittels eines Demultiplexers in Kombination mit einem Summationsverstärkers erfolgt.

58. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der Eingangssignale beeinflusst werden.

59. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt.

60. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt.

61. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale zur Generierung eines Bildes verwendet wird.

62. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird.

63. Anordnung nach mindestens einem der vorange-

henden Ansprüche, wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt.

64. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Summensignale mit einer lookup-Tabelle kombiniert werden.

65. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei mittels der lookup-Tabelle eine Darstellung verschiedener Farbstoffe und/oder der Spreizung des generierten Bildes erfolgt.

66. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt.

67. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen Detektionskanals erfolgt.

68. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs erfolgt.

69. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer Integratorschaltung generiert werden.

70. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonen-zählung und anschließender Digital/Analogwandlung generiert werden.

71. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonen-zählung zeitkorreliert erfolgt.

72. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz.

73. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening, wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Mikroskop.

74. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

75. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

76. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels konfokaler Detektion.

77. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung.

78. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung.

79. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scantisch.

80. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels nichtkonfokaler Detektion.

81. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung.

82. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit descannter Detektion.

83. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Hellfeldabbildung.



84. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Punktabbildung.

85. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit nicht descannter Detektion.

86. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit Hellfeldabbildung. 5

87. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt- oder Hellfeldabbildung. 10

88. Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einem X/Y Scantisch.

---

Hierzu 12 Seite(n) Zeichnungen

---

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

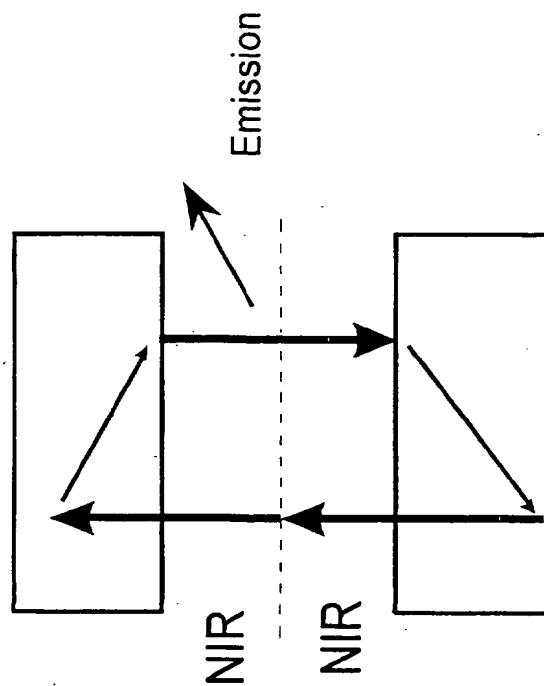


Fig.1b

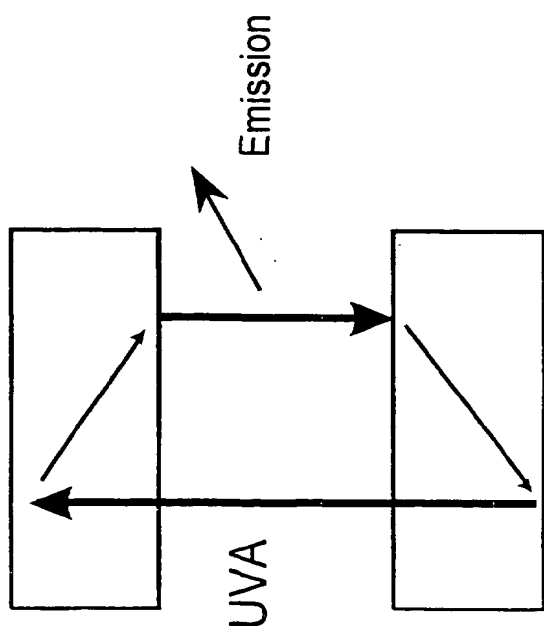


Fig.1a

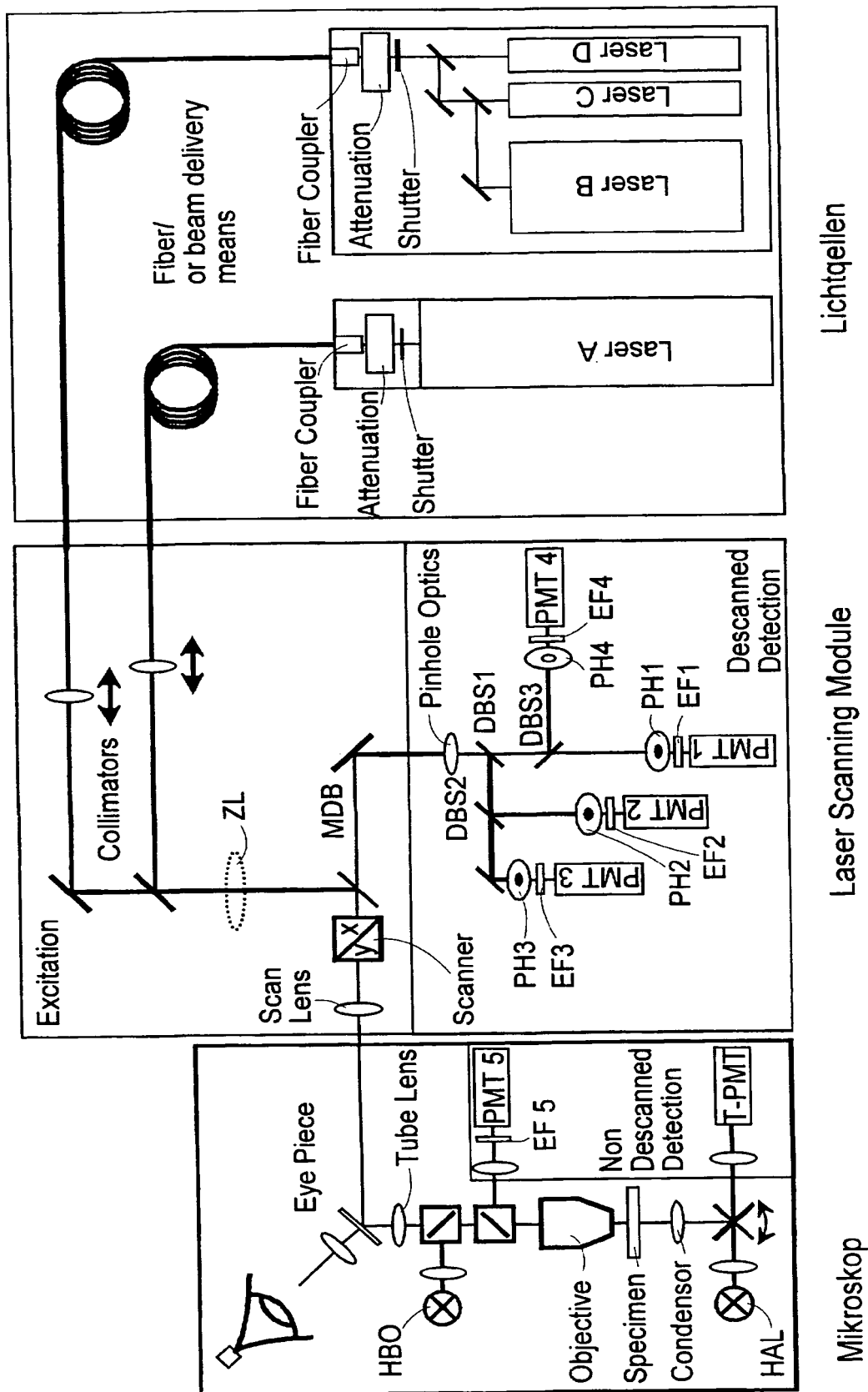


Fig.2

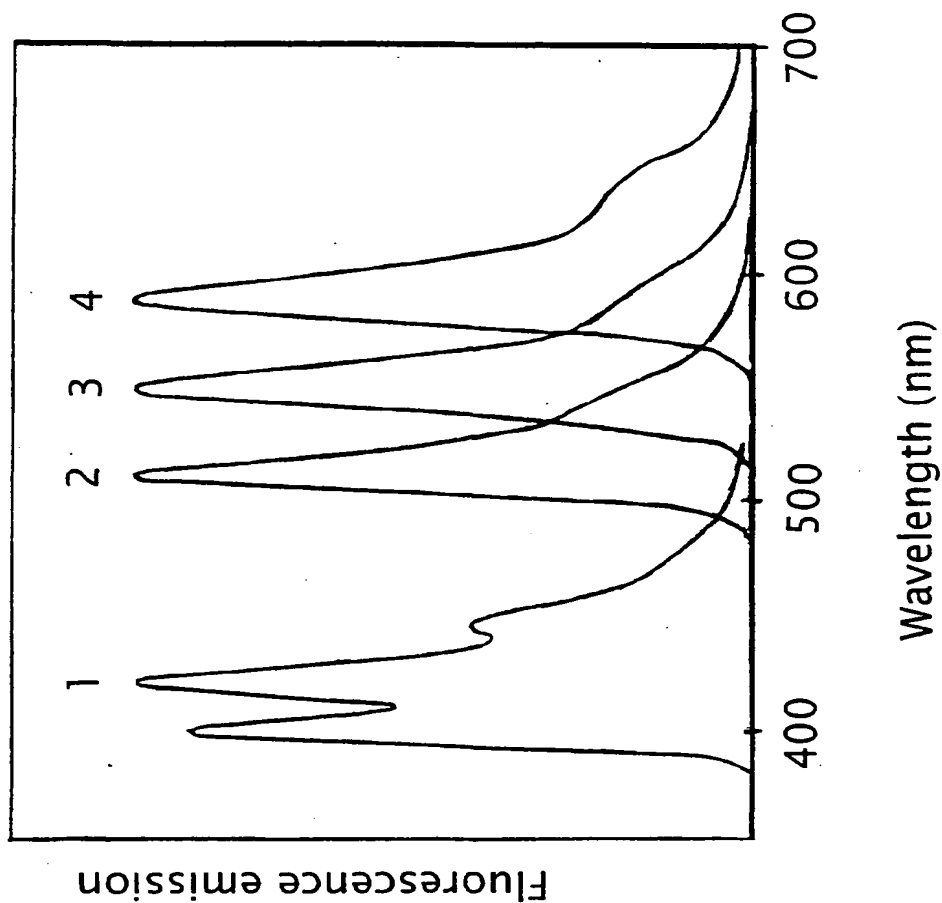


Fig. 3a

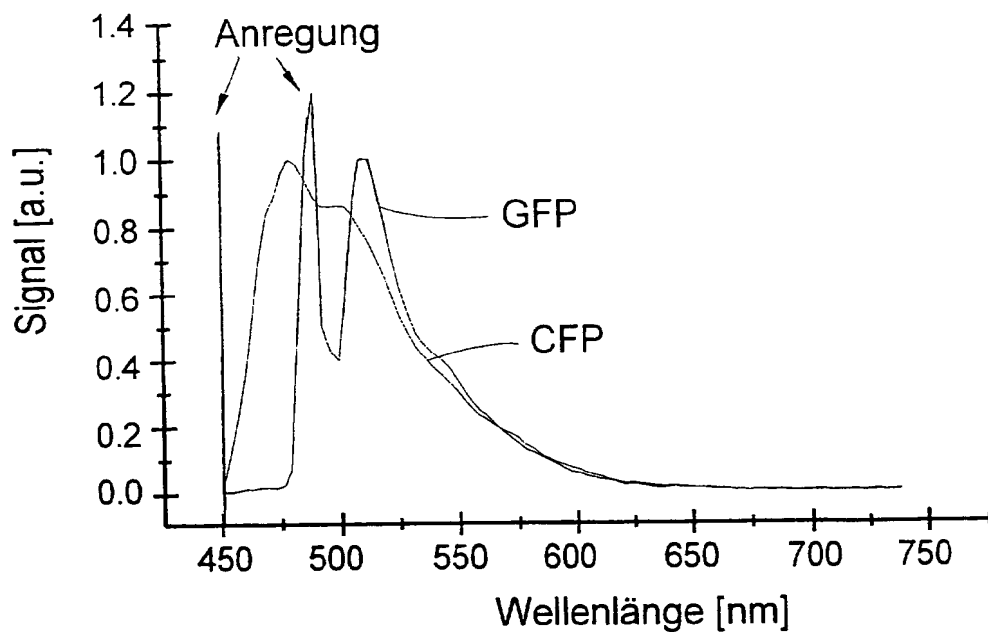


Fig.3b

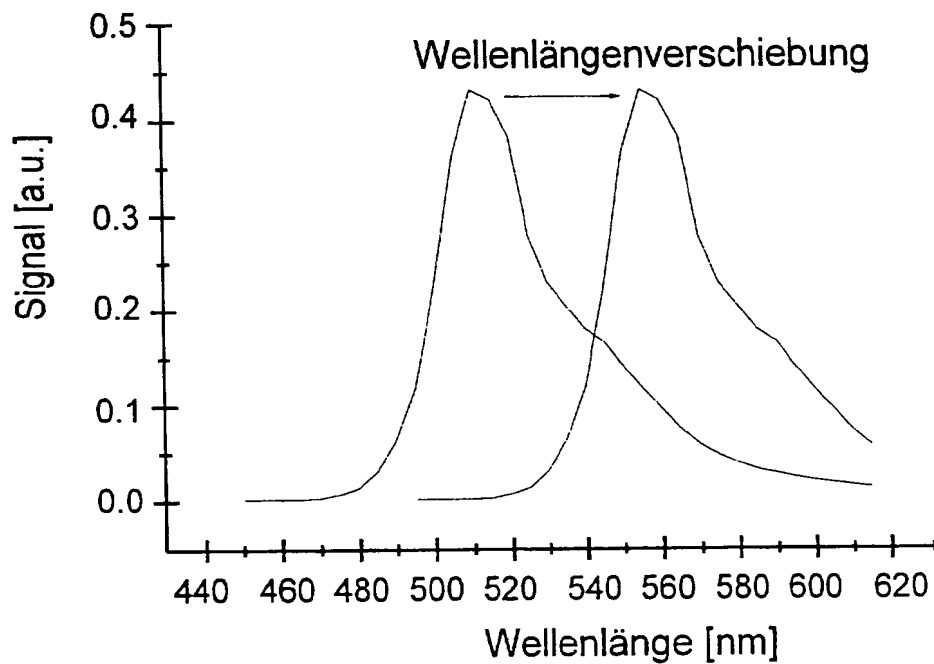


Fig.3c

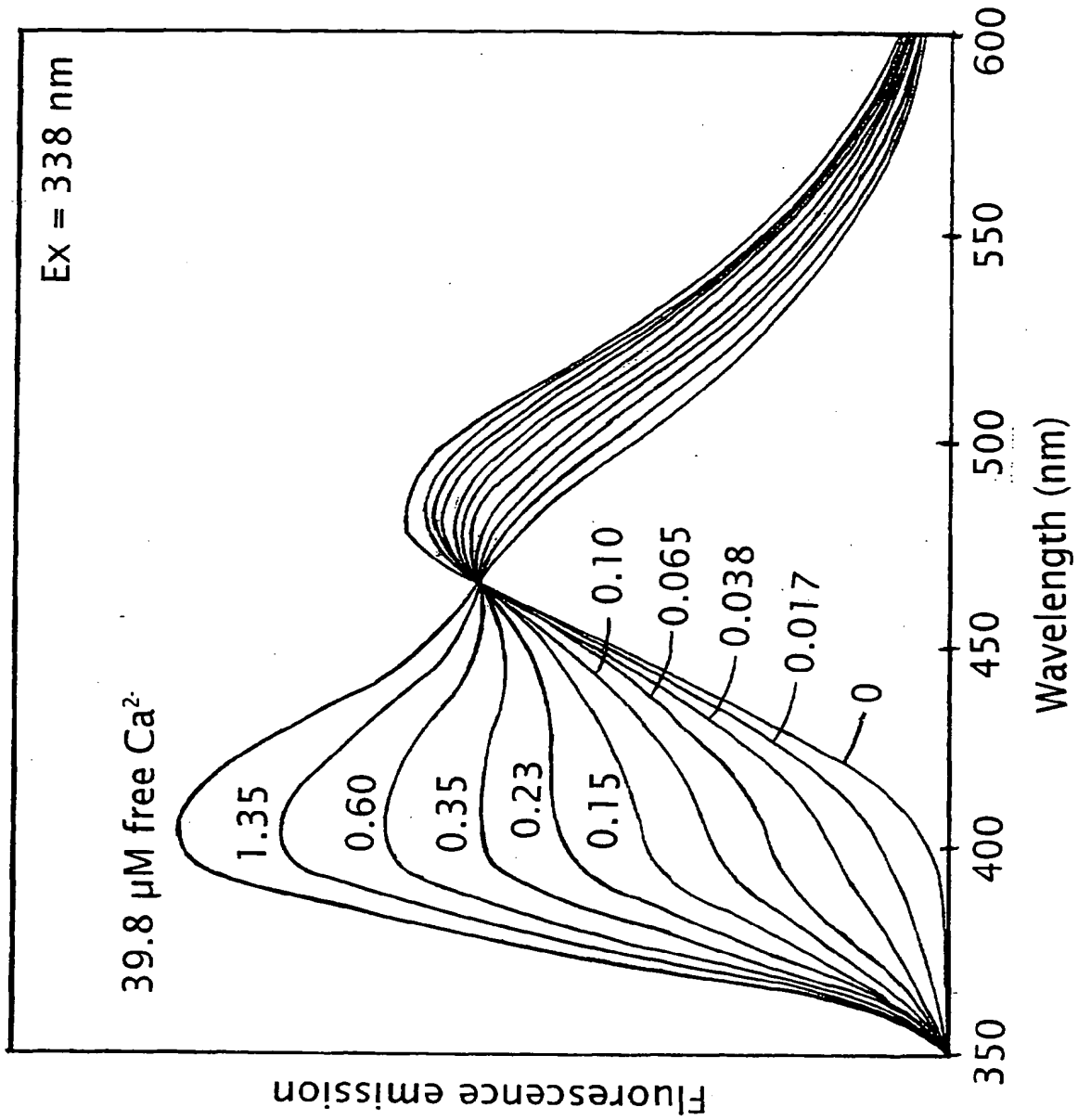


Fig.4a



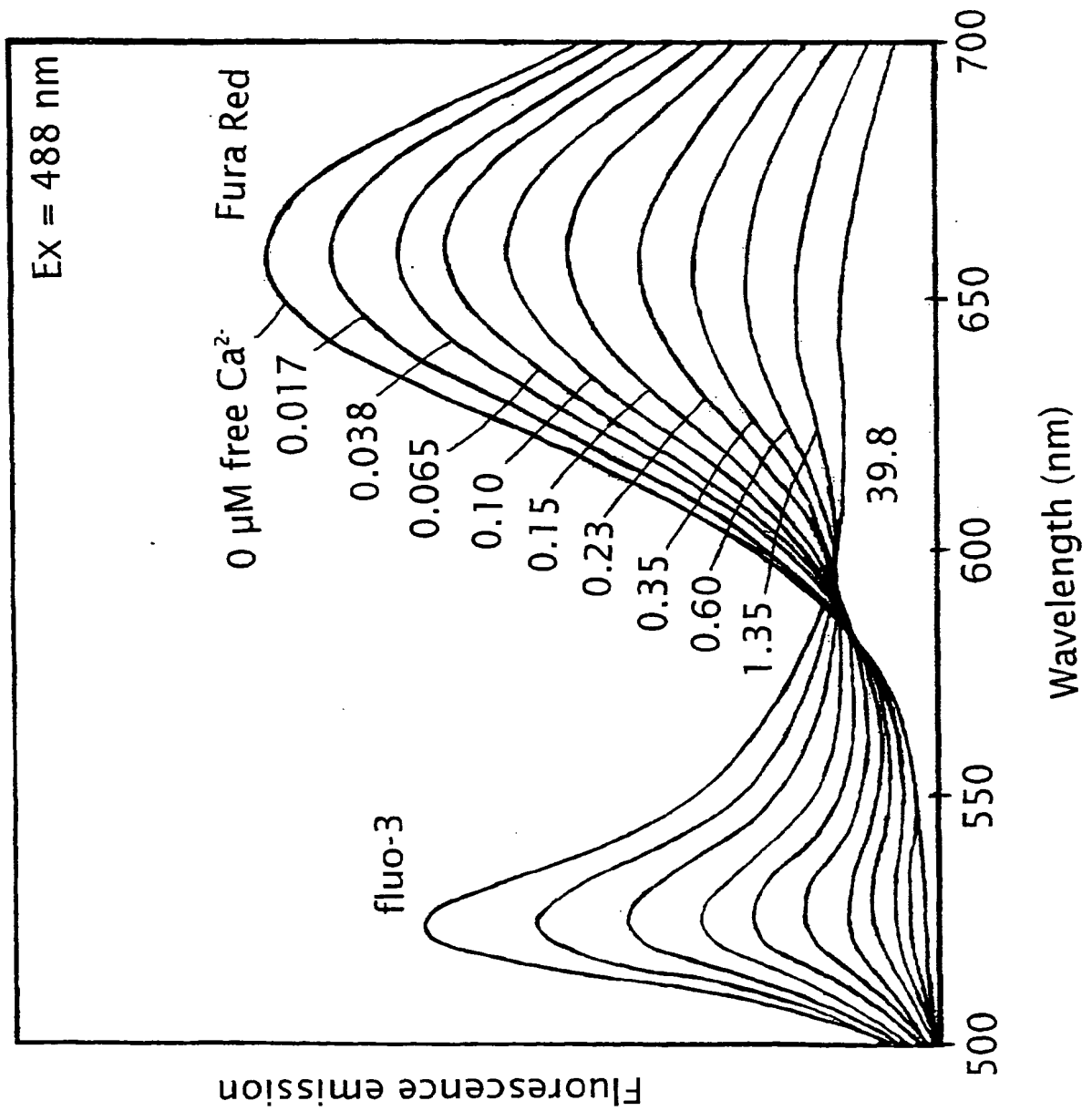
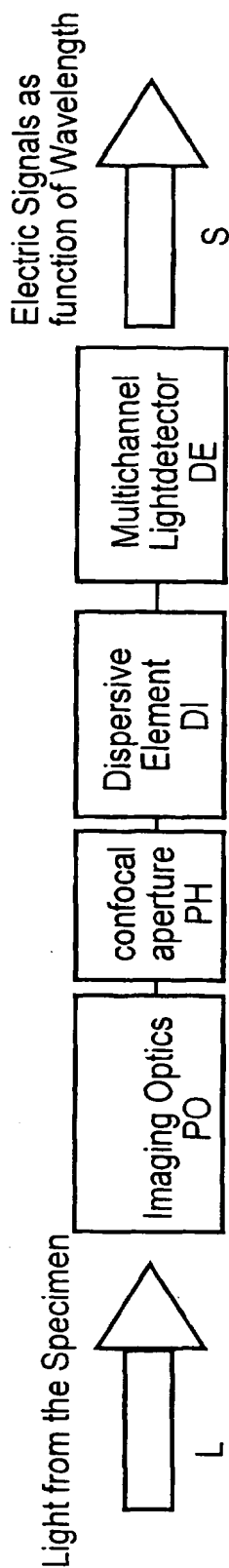


Fig.4b

### Components for confocal Detection



### Components for non-descanned Detection

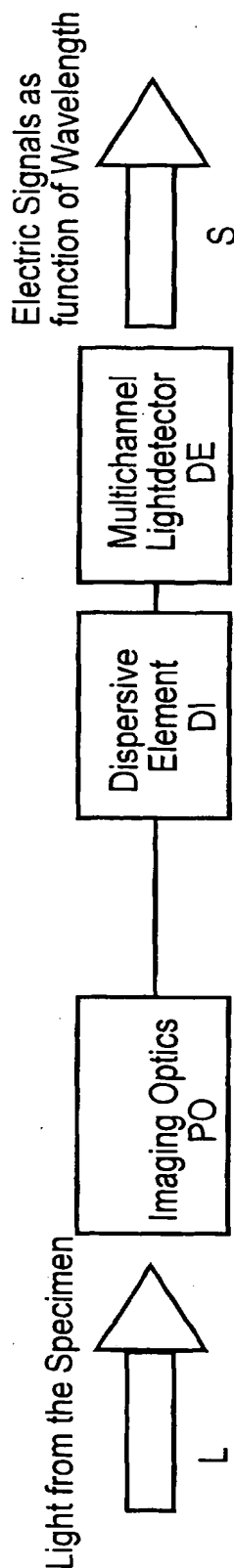


Fig.5

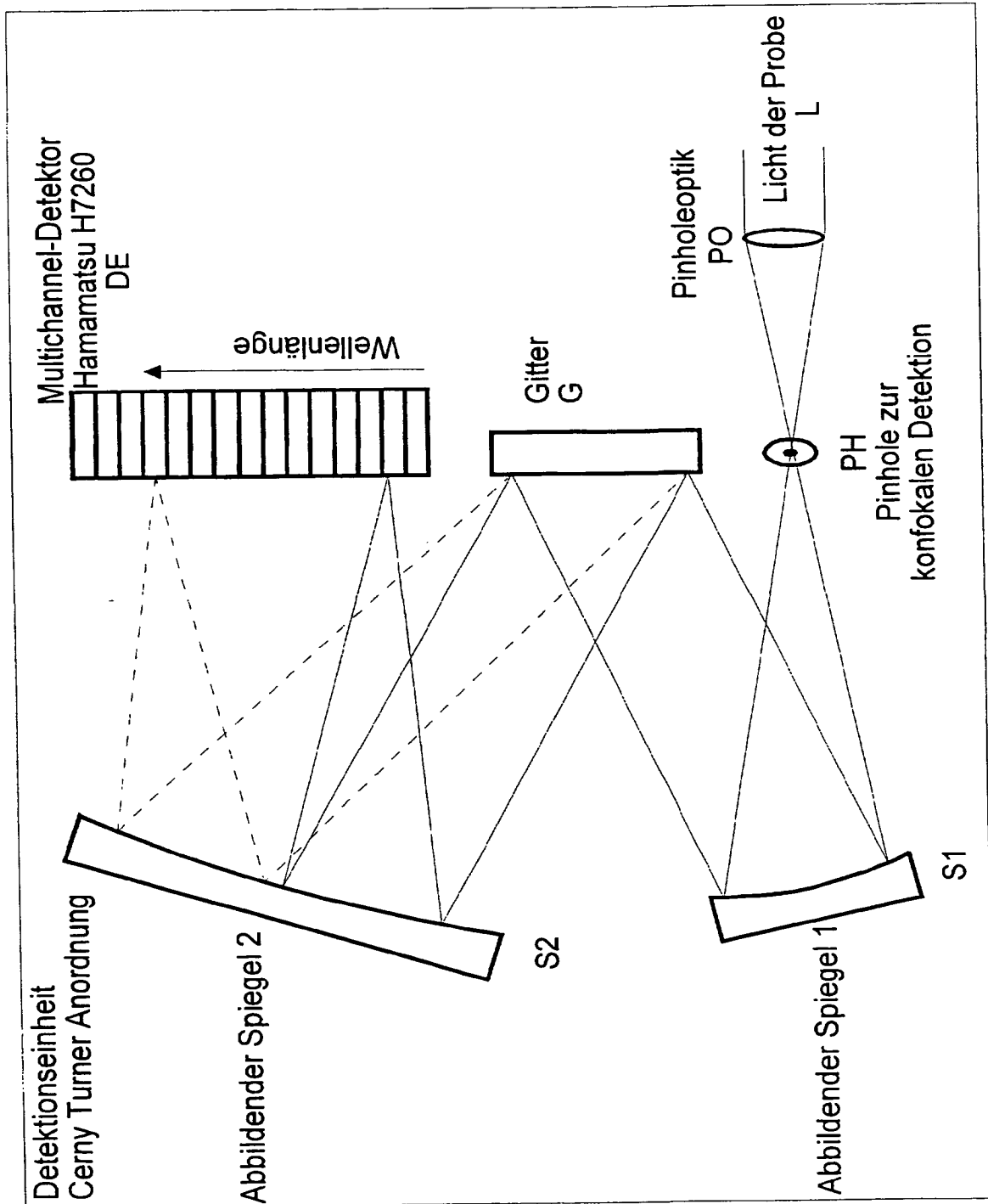


Fig.6

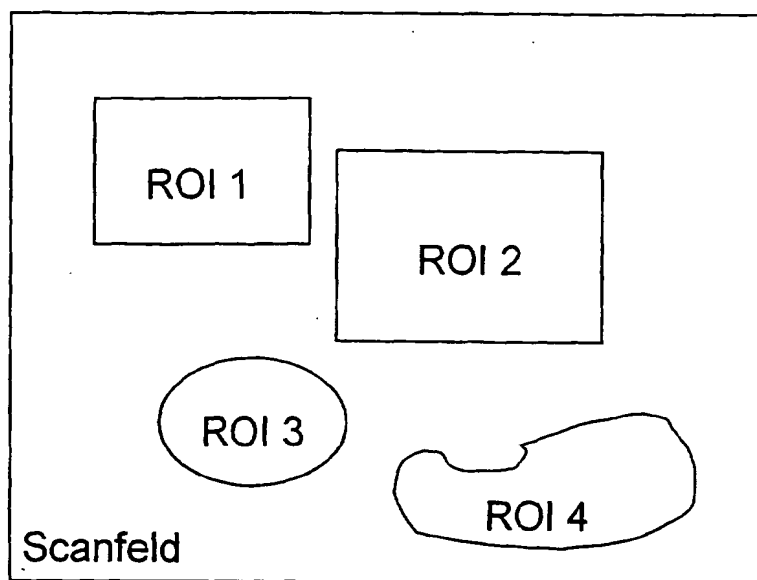
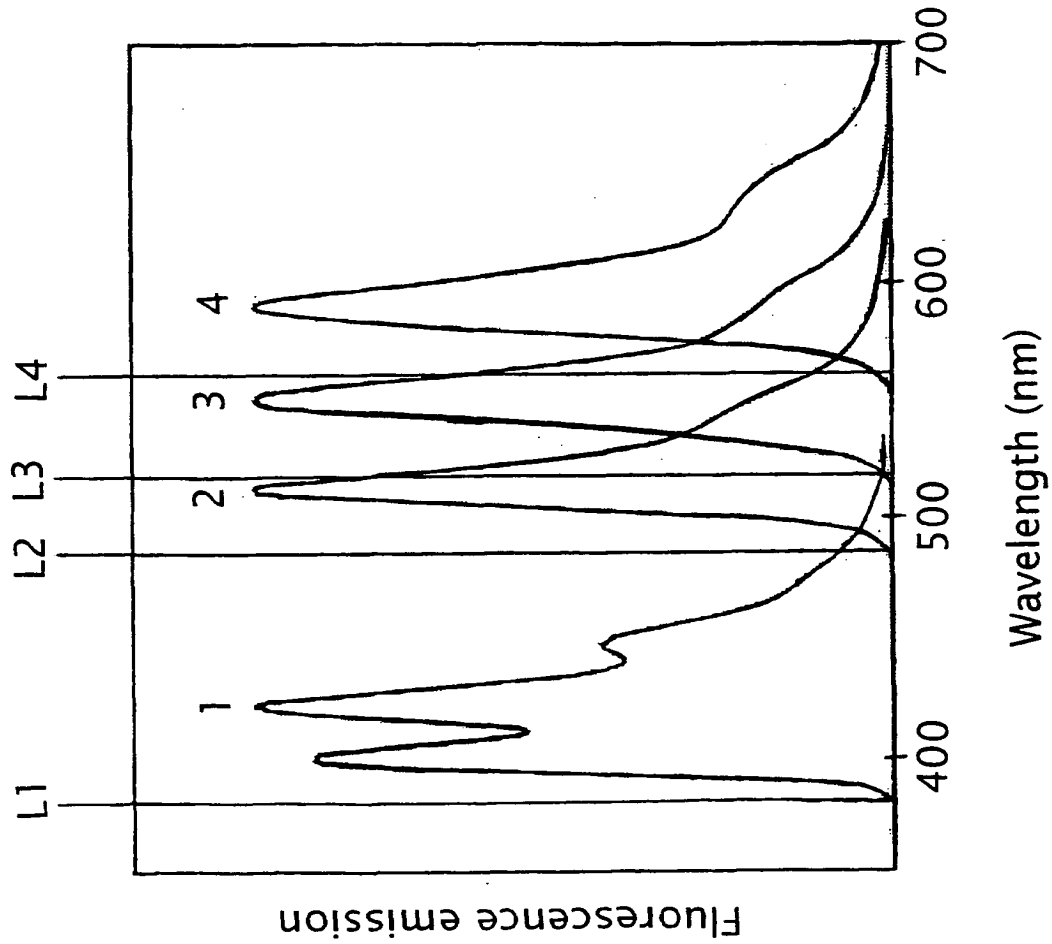
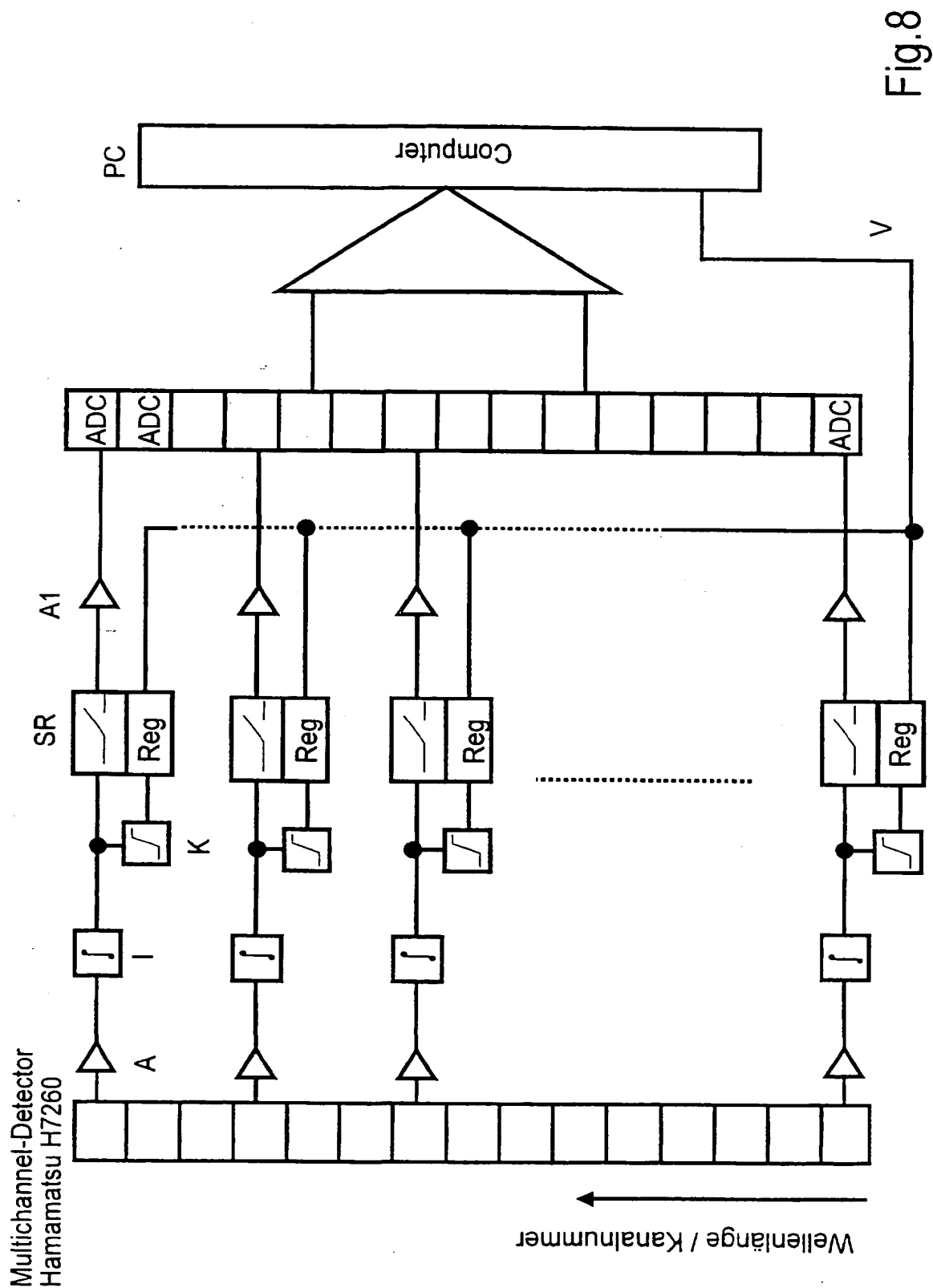


Fig.7a



**Fig.7b**



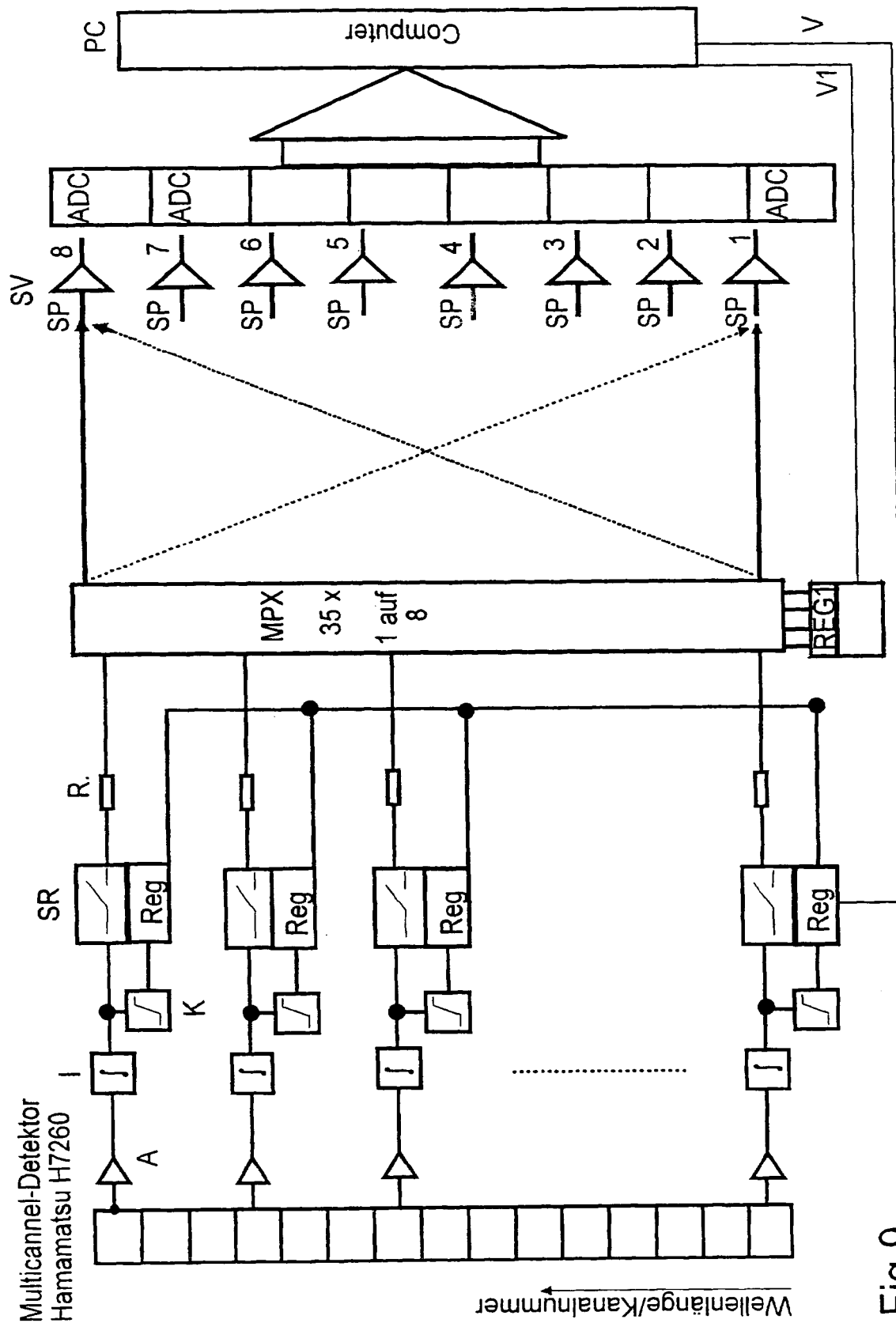


Fig. 9